

20. 7. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

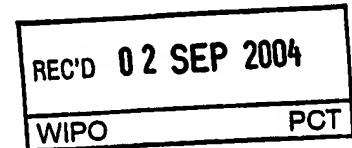
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 7 月 1 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 9 9 1 9 2
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 1 9 9 1 9 2]

出 願 人 持 田 製 薬 株 式 会 社
Applicant(s):

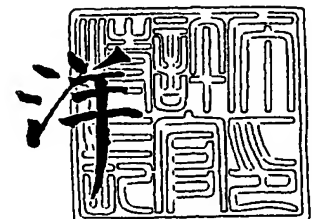


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 8 月 1 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0096
【提出日】 平成15年 7月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 16/00
【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市玉櫛2丁目30-11

【氏名】 高山 博史

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

【氏名】 白川 嘉門

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

【氏名】 山川 徹

【特許出願人】

【識別番号】 000181147

【氏名又は名称】 持田製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100092783

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 浩

【電話番号】 03-3273-2611

【選任した代理人】

【識別番号】 100095360

【弁理士】

【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

【識別番号】 100093676

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 純子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0304690

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗血小板膜糖蛋白質VIモノクローナル抗体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト血小板膜糖蛋白質VIと特異的に結合し、生体内に投与することでコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制するモノクローナルヒト抗体またはその活性断片。

【請求項2】 ヒト血小板膜糖蛋白質VIに特異的に結合し、コラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制するが、単独ではヒト血小板凝集を惹起しないモノクローナルヒト抗体またはその活性断片。

【請求項3】 配列番号1のアミノ酸配列をVH CDR1に、配列番号2のアミノ酸配列をVH CDR2に、配列番号3のアミノ酸配列をVHCDR3に、配列番号4のアミノ酸配列をVLCDR1に、配列番号5のアミノ酸配列をVLCDR2に、配列番号6のアミノ酸配列をVLCDR3に、それぞれ有する抗体もしくはその活性断片、または配列番号7のアミノ酸配列をVH CDR1に、配列番号8のアミノ酸配列をVH CDR2に、配列番号9のアミノ酸配列をVHCDR3に、配列番号10のアミノ酸配列をVLCDR1に、配列番号11のアミノ酸配列をVLCDR2に、配列番号12のアミノ酸配列をVLCDR3に、それぞれ有する抗体もしくはその活性断片。

【請求項4】 #2-37細胞（受託番号FERM P-19400）または#2-4細胞

【請求項5】 請求項4の細胞が産生するモノクローナル抗体またはその活性断片。

【請求項6】 請求項1ないし3、および請求項5の抗体またはその活性断片を有効成分として含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト血小板膜糖蛋白質VI（以下、GPVIと略称することがある）に対する抗体および該抗体を産生する細胞に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

血小板は血液凝固・生体防御において極めて重要な役割を担っており、生理的な役割から種々の病態における関わりが解明されつつある。特に、血小板は止血血栓を形成するという機能においても注目されており、例えば、血管内皮細胞が損傷を受けると、血管内皮下の主要なマトリックス蛋白質であるコラーゲンが露出し、ここへ血小板が粘着する。次に、コラーゲンからのシグナルにより血小板が活性化され、最終的にはフィブリノーゲンを介して血小板が凝集する。そして場合によってはこれが血栓塞栓性疾患のような病的状態の原因となることから治療の標的として注目されている。

【0003】

従来、血小板凝集に基づく血栓症の治療・予防の目的で、アスピリン、チクロピジン、GPIIb/IIIa アンタゴニスト等の抗血小板薬が用いられてきたが、有効性および出血等の副作用の面から多くの問題が指摘されており、これらの問題の無い、十分な安全性、および確実かつ適切な作用を有する優れた抗血小板薬の登場が望まれている。

血小板膜上に存在するGPVIは、現在では血小板のコラーゲン受容体であり、コラーゲン刺激による血小板の活性化に中心的役割を担っていることが明らかにされている（非特許文献1参照）。すなわち、スギヤマらは自己免疫性血小板減少患者の血小板では62kDaの膜蛋白質が特異的に欠損しており、コラーゲンによる血小板凝集が認められないこと（非特許文献2参照）、さらに、この患者の血小板で欠損していた蛋白がGPVIであり、患者の血清より精製した抗体のFab断片がコラーゲン惹起血小板凝集を抑制することを報告している（非特許文献2および非特許文献3参照）。

【0004】

これまでに患者由来の抗ヒトGPVI自己抗体は、スギヤマら（非特許文献2参照）やタカハシら（非特許文献4参照）が報告している。しかしながら、スギヤマらの報告では患者血漿を精製した抗ヒトGPVI自己抗体には血小板凝集を惹起する作用があり、直ちに医薬応用はできない。非特許文献4はGPVIと推測される約62kDaの蛋白に対する自己抗体の存在について記載されているが、この抗体が血

血小板凝集を惹起するか否かは明確ではない。また医薬として臨床応用するためには安全性の高い抗体を安定した品質で大量に生産する必要があるが、工業的に生産する方法は未だ確立されていない。

【0005】

現在までに作製されている抗GPVI抗体として、マウスGPVIに対するモノクローナルラット抗体（特許文献1参照）、およびヒトGPVIに対するモノクローナルマウス抗体がある（特許文献2および特許文献3参照）。これらは、非ヒト動物由来の抗体であり、ヒトに投与した場合、高度な免疫原性（「抗原性」という場合もある）を有するために副作用が危惧され、該抗体をそのままヒトに投与することは不適当であり、ヒトに投与する抗体は純粹にヒト由来のヒト抗体であることが求められている。

また、ヒトGPVIを認識するヒト一本鎖抗体（scFv: single chain Fv）がファージディスプレイ法等を用いて作製されている（特許文献2、特許文献3、および非特許文献5参照）。これらの一本鎖抗体はヒト抗体のVHとVLをペプチドリinkerで結合させたものであり、ヒト由来の可変領域を有する抗体であるが、細胞が産生する通常のイムノグロブリンに比べると、一般的に抗原への親和性が低く、生体内での半減期も短い。

【0006】

CDR（相補性決定領域）移植等によるヒト化抗体の作製方法は公知であるが、CDRのアミノ酸配列および多くの場合にはフレームワーク領域（FR）の一部が非ヒト動物抗体由来であり、抗体のアミノ酸配列のすべてがヒト由来ではないために、投与した抗体に対する抗体が生体内で産生される可能性が指摘されており、免疫原性の面から医薬として有効でかつ安全なものとは言えない。ヒト抗体の作製について複数の報告があるが、いずれの報告の方法も種々の問題点を有し、あらゆる抗原に適用可能な一般化された方法であるとは認識されていないのが現状であり、一般的に高力価のヒト抗体を取得することは困難である。

【0007】

【特許文献1】

欧州特許出願公開公報第1228768号

【特許文献2】

国際特許出願公開公報第01/00810号

【特許文献3】

国際特許出願公開公報第02/080968号

【0008】

【非特許文献1】

高山博史, 日本血栓止血学会誌, 2003年, 第14巻, 第2号, p. 75-81

【非特許文献2】

タテオ・スギヤマ (Tateo Sugiyama)、外5名, ブラッド (Blood), (米国), 1987年, 第69巻, 第6号, p. 1712-1720

【非特許文献3】

マサアキ・モロイ (Masaaki Moroi)、外3名, ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation), (米国), 1989年, 第84巻, 第5号, p. 1440-1445

【非特許文献4】

ホウユウ・タカハシ (Hoyu Takahashi)、外1名, アメリカン・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (American Journal of Hematology), (米国), 2001年, 第67巻, 第4号, p. 262-267

【非特許文献5】

ピーター・A・スメサースト (Peter A Smethurst)、外15名, ブラッド (Blood), (米国), 2002年, 第100巻, 第11号, p. 474a

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

このように抗血小板薬として、安全性が高く、有効性が優れ、かつ使いやすい薬剤が求められている状況において、ヒトに投与可能な、純粹にヒト由来の抗GPVI抗体が切望されている。

本発明の目的は、ヒト血小板膜上に存在する糖蛋白質であるGPVIに特異的に結合する新規なモノクローナル抗体を提供するものである。特にヒトに投与可能で

、有効でかつ副作用の点で問題のない、純粹にヒト由来である抗GPVIモノクローナルヒト抗体を提供するものである。また、ヒトGPVIに特異的に結合し新規なCDR配列を含有する抗体を提供するものである。

さらに、これらの抗体を産生する細胞、具体的には特定のハイブリドーマを提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、GPVIに対する自己抗体を産生するヒトのリンパ球を出発材料として、GPVIを介する血小板凝集を効果的に抑制するヒト抗体の取得を着想した。この着想に基づき、鋭意研究を重ねた結果、末梢血リンパ球を特定の条件の体外免疫法 (in vitro immunization) で活性化し、マウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製したところ、複数のハイブリドーマから、GPVIとの結合能を有し、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する活性を有する抗体を産生するハイブリドーマを得ることに成功した。そして、当該クローンを単離し、さらに検討を重ねた結果、該抗体をコードする遺伝子を得ることに成功し、この抗体のCDRのアミノ酸配列が新規の配列であることを明らかにし、本発明を完成した。

【0011】

本発明の第1の態様は、ヒトGPVIに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体（以下抗ヒトGPVIモノクローナルヒト抗体と記載することがある）またはその活性断片である。具体的には、

(1) ヒトGPVIと特異的に結合し、生体内に投与することでコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制するモノクローナルヒト抗体またはその活性断片で、好ましくは、該抗体または活性断片を生体内へ投与した後に血液中より単離した血小板について、コラーゲンにより惹起される凝集能が通常血小板に比べて低下あるいは認められないもの、

(2) ヒトGPVIと特異的に結合し、血小板上のGPVIとコラーゲンとの結合を特異的に阻害する、血小板上の機能的なGPVIを消失させる、あるいは、単離ヒト血小板と接触させることによりコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制す

る、いずれか一つ以上の作用を合わせて持つモノクローナルヒト抗体またはその活性断片、

(3) 血小板上のヒト GPVI を該血小板の細胞内に取り込ませる (internalize)、もしくは、切断することによりコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制する、前記 (1) ないし (2) の抗体またはその活性断片である。

前記 (1) ないし (3) の抗体は、ヒト GPVI と抗体との解離定数 (K_d 値) が好ましくは 100nM 以下、より好ましくは 50nM 以下の抗体である。

ここで前記 (1) ないし (3) の抗体のうち、ヒト GPVI とコラーゲンとの結合を阻害する抗体は、好ましくは 10nM 以下、より好ましくは 1nM 以下、さらに好ましくは 0.1nM 以下の解離定数 (K_d 値) でヒト GPVI とコラーゲンとの結合を阻害する抗体である。

活性断片とは、GPVI との結合能を有する限りにおいて、例えば、Fab (Fragment of antigen binding)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (scFv)、ジスルフィド安定化抗体 (dsFv)、CDR を含むペプチド等である。

また、具体的には、

(4) ヒト GPVI に特異的に結合し、コラーゲンによるヒト血小板の凝集を特異的に抑制するがトロンビンによる凝集は抑制せず、単独ではヒト血小板凝集を惹起しないモノクローナルヒト抗体またはその活性断片である。該抗体は、コラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制する濃度または用量と同等、好ましくは 10 倍、より好ましくは 100 倍、さらに好ましくは 1000 倍において、単独ではヒト血小板凝集を有意に惹起しない抗体またはその活性断片である。

【0012】

本発明の第 2 の態様は、新規な CDR アミノ酸配列または可変領域アミノ酸配列を含有する抗ヒト GPVI モノクローナル抗体である。具体的には、

(5) 少なくとも抗体の H 鎖または L 鎖の一方の 3 組の CDR、好ましくは抗体の H 鎖および L 鎖両方の 6 組の CDR が、表 3 に記載のクローン、好ましくはクローン # 2-37 および # 2-4 からなる群から選択される何れかのハイブリドーマが産生する抗体の CDR のアミノ酸配列を、それぞれ対応する CDR のアミノ酸配列として含有する抗ヒト GPVI モノクローナル抗体またはその活性断

片、

(6) 配列番号 1 のアミノ酸配列を VH CDR1 に、配列番号 2 のアミノ酸配列を V H CDR2 に、配列番号 3 のアミノ酸配列を VHCDR3 に、配列番号 4 のアミノ酸配列を VLCDR1 に、配列番号 5 のアミノ酸配列を VLCDR2 に、配列番号 6 のアミノ酸配列を VLCDR3 に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、または配列番号 7 のアミノ酸配列を VH CDR1 に、配列番号 8 のアミノ酸配列を VH CDR2 に、配列番号 9 のアミノ酸配列を VHCDR3 に、配列番号 10 のアミノ酸配列を VLCDR1 に、配列番号 11 のアミノ酸配列を VLCDR2 に、配列番号 12 のアミノ酸配列を VLCDR3 に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、

(7) 少なくとも抗体の H 鎖または L 鎖の可変領域、好ましくは抗体の H 鎖および L 鎖両方の可変領域が、表 3 に記載のクローン、好ましくはクローン # 2-37 および # 2-4 からなる群から選択される何れかのハイブリドーマが産生する抗体が有する可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ対応する可変領域のアミノ酸配列として含有するヒト GPVI 抗体またはその活性断片、

(8) 配列番号 13 のアミノ酸配列を H 鎖の可変領域に、配列番号 14 のアミノ酸配列を L 鎖の可変領域に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、または配列番号 15 のアミノ酸配列を H 鎖の可変領域に、配列番号 16 のアミノ酸配列を L 鎖の可変領域に、それぞれ含有する抗体もしくはその活性断片、

(9) # 2-37 細胞 (受託番号 FERM P-19400) または # 2-4 細胞が産生するモノクローナル抗体またはその活性断片である。

【0013】

本発明の第 3 の態様は、第 1 または第 2 の態様の抗体を産生する細胞である。
具体的には、

(10) 前記 (1) ないし (9) に記載のいずれかの抗体を産生する形質転換細胞、

(11) # 2-37 細胞 (受託番号 FERM P-19400) または # 2-4 細胞である、前記 (10) 記載の細胞である。

【0014】

本発明の第 4 の態様は、第 1 または第 2 の態様の抗体またはその活性断片をコ

ードするポリヌクレオチドである。具体的には、第1または第2の態様の抗体またはその活性断片をコードするポリヌクレオチドであって、

(12) 少なくとも抗体のH鎖またはL鎖の一方の3組のCDR、好ましくは抗体のH鎖またはL鎖の両方の6組のCDRをコードする塩基配列として、表3に記載のクローン、好ましくはクローン#2-37および2-4からなる群から選択される何れかのハイブリドーマの抗体の遺伝子においてそれぞれ対応するCDRをコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(13) VH CDR1をコードする配列番号17の塩基配列と、VH CDR2をコードする配列番号18の塩基配列と、VH CDR3をコードする配列番号19の塩基配列と、VL CDR1をコードする配列番号20の塩基配列と、VL CDR2をコードする配列番号21の塩基配列と、VL CDR3をコードする配列番号22の塩基配列とを、それぞれ含有するポリヌクレオチド、またはVH CDR1をコードする配列番号23の塩基配列と、VH CDR2をコードする配列番号24の塩基配列と、VH CDR3をコードする配列番号25の塩基配列と、VL CDR1をコードする配列番号26の塩基配列と、VL CDR2をコードする配列番号27の塩基配列と、VL CDR3をコードする配列番号28の塩基配列とを、それぞれ含有するポリヌクレオチド、

(14) 少なくとも抗体のH鎖またはL鎖の可変領域、好ましくは抗体のH鎖およびL鎖両方の可変領域として、表3に記載のクローン、好ましくはクローン#2-37および#2-4からなる群から選択される何れかのハイブリドーマの抗体の遺伝子においてそれぞれ対応する可変領域をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(15) H鎖の可変領域をコードする配列番号29の塩基配列と、L鎖の可変領域をコードする配列番号30の塩基配列とを含有するポリヌクレオチド、またはH鎖の可変領域をコードする配列番号31の塩基配列と、L鎖の可変領域をコードする配列番号32の塩基配列とを含有するポリヌクレオチドである。

【0015】

本発明の第5の態様は、第1または第2の態様の抗体を製造する方法である。具体的には第1または第2の態様の抗体を製造する方法であって、

(16) 前記(10)の細胞を培養する工程および、該細胞が産生するモノク

ローナル抗体を採取する工程を含む製造方法、

(17) 前記(11)の細胞を培養する工程および、該細胞が産生するモノクローナル抗体を採取する固定を含む製造方法である。

【0016】

本発明の第6の態様は、本件第1または第2の態様の抗体を有効成分として含有する医薬組成物に関するもので、好ましくは血栓性、塞栓性または動脈硬化性の疾患の予防および／または治療のための医薬組成物である。

【0017】

本発明の第7の態様は、本件第1または第2の態様の抗体を用いて試料中のGPVIを検出または定量することにより疾患の診断をする方法であって、好ましくは血液凝固異常に関連する疾患の診断をする方法である。

【0018】

【発明の実施の形態】

(構成)

本件発明の第1の態様の抗体は、ヒト血小板上に存在する膜糖蛋白質であるGPVIを特異的に認識するものである。なお、本発明の抗体が認識するGPVIは必ずしも血小板上のものに限られず、例えば、巨核球のGPVIをも認識し得るのである。以下に、本発明をさらに詳しく説明する。

本発明の抗体は、モノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体の作製方法には特定の方法に限らず、例えばハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体、抗体の遺伝子を組み込んだ組換え細胞が産生したモノクローナル抗体、またはEBV（エプスタイン・バーウイルス）により形質転換した細胞が産生するモノクローナル抗体のいずれであってもよい。

【0019】

ヒト抗体とは、可変領域全体および定常領域全体のいずれもがヒト由来のアミノ酸配列からなる抗体である。本発明のヒト抗体の作製方法は特定の方法に限らず、例えばヒト-ヒトハイブリドーマが産生したヒト抗体、トランスジェニック動物が産生したヒト抗体、ヒト抗体の遺伝子を組み込んだ組換え細胞が産生したヒト抗体、EBVにより形質転換したヒト細胞が産生するヒト抗体、または自己

抗体を産生するヒトのリンパ球を用いて作製したハイブリドーマが産生したヒト抗体のいずれであってもよい。

【0020】

本発明の抗体はヒトGPVIと特異的に結合する抗体である。本発明の抗体はヒトGPVIと抗体との解離定数 (K_d 値) が好ましくは100nM以下、より好ましくは50nM以下である。ヒトGPVIと抗体との解離定数を測定する方法は特定の方法に限定されず、常法により行うことができる。例えば、チップ上に固定化したGPVI-Fcを用いてBIACORE 3000のような蛋白質相互作用解析装置により測定することができる。具体的には、実施例7に示されている。

【0021】

本発明の抗体はコラーゲンによるヒト血小板の凝集を抑制する作用を有するものである。ここで、血小板凝集は公知の方法で測定し得るが、例えば、血小板凝集能測定装置等で光透過率を指標として凝集率を計算することにより測定でき、一般的には、光透過率が最大となる点の凝集率 (以下、最大凝集率と称することがある) で表される。後述の実施例6に記載された方法において、本発明の抗体は好ましくは10 μ g/mL以下、より好ましくは1 μ g/mL以下、さらに好ましくは0.1 μ g/mL以下の濃度で、最大凝集率を好ましくは対照の50%以下に、より好ましくは対照の30%以下に、さらに好ましくは対照の20%以下に、最も好ましくは対照の10%以下に減少させる。コラーゲンによるヒト血小板の凝集の抑制を測定する方法は上記の方法に限定されず、他の常法によっても行うことができる。

【0022】

本発明の抗体は、好ましくは、コラーゲン以外の血小板凝集を惹起する物質、例えばトロンビンによる凝集は抑制せず、後述の実施例6に記載された方法において、本発明の抗体は好ましくは0.1 μ g/mL以上、より好ましくは1 μ g/mL以上、さらに好ましくは10 μ g/mL以上、特に好ましくは100 μ g/mLの抗体濃度で、最大凝集率が好ましくは対照の80%以上、より好ましくは対照の85%以上、さらに好ましくは対照の90%以上、特に好ましくは対照の95%以上である。コラーゲン以外の血小板凝集を惹起する物質によるヒト血小板の凝集の抑制を測定する方法は上記の方法に限定されず、他の常法によっても行うことができる。

【0023】

本発明の抗体は抗体単独、すなわち血小板凝集を惹起させる物質の非存在下においてヒト血小板の凝集を抑制せず、後述の実施例6に記載された方法において、好ましくは $0.1\mu\text{g/mL}$ 以上、より好ましくは $1\mu\text{g/mL}$ 以上、さらに好ましくは $10\mu\text{g/mL}$ 以上、特に好ましくは $100\mu\text{g/mL}$ の抗体濃度で、最大凝集率が好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下である。抗体単独でのヒト血小板凝集を測定する方法は必ずしも限定されず、他の常法によっても行うことができる。

【0024】

本発明の抗体は血小板上のGPVIとコラーゲンとの結合を特異的に阻害するものであって、後述の実施例7に記載された方法において、本発明の抗体はGPVIとコラーゲンの結合を好ましくは $100\mu\text{g/mL}$ 以下で、より好ましくは $10\mu\text{g/mL}$ 以下、さらに好ましくは $1\mu\text{g/mL}$ 以下、特に好ましくは $0.1\mu\text{g/mL}$ の IC_{50} 値で阻害する抗体である。コラーゲンとGPVIとの結合を測定する方法は特定の方法に限定されず、他の常法により行うことができる。

【0025】

本発明の抗体は生体内に投与することで、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する。本発明の抗体がコラーゲンによる血小板凝集を抑制する機序としては、(i)血管内皮細胞傷害により露出したコラーゲンと血小板上に存在するGPVIとの結合を本発明の抗体が阻害する、(ii)本発明の抗体をあらかじめ血小板上に存在するGPVIに結合させておきコラーゲンと結合できない状態にする、(iii)本発明の抗体が血小板及び／または巨核球上のGPVIと結合することでGPVIを内部に取り込ませて(internalize)、結果として血小板表面からGPVIを消失させる、または(iv)本発明の抗体の有する活性により血小板及び／または巨核球表面に存在するGPVIを切断して結果として血小板表面からGPVIを消失させる、等が考えられる。本発明のヒト抗体によるコラーゲンによる血小板凝集抑制の機序としては何れでも良いが、複数の機序を併せ持ってもよい。

【0026】

本発明の第2の態様として、新規なCDRアミノ酸配列または可変領域アミノ酸配列を含有する抗ヒトGPVIモノクローナル抗体がある。

抗体の重鎖および軽鎖のN末端側には可変領域が存在し、それぞれ重鎖可変領域 (VH)、軽鎖可変領域 (VL) と呼ばれる。可変領域内には相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) が存在し、この部分が抗原認識の特異性を担っている。可変領域のCDR以外の部分は、CDRの構造を保持する役割を有し、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれる。重鎖および軽鎖のC末端側には定常領域が存在し、それぞれ重鎖定常領域 (CH)、軽鎖定常領域 (CL) と呼ばれる。

【0027】

重鎖可変領域中には、第1の相補性決定領域 (CDR1)、第2の相補性決定領域 (CDR2) および第3の相補性決定領域 (CDR3) の3つの相補性決定領域が存在する。重鎖可変領域中の3つの相補性決定領域をまとめて重鎖相補性決定領域と呼ぶ。軽鎖可変領域中にも同様に、第1の相補性決定領域 (CDR1)、第2の相補性決定領域 (CDR2) および第3の相補性決定領域 (CDR3) の3つの相補性決定領域が存在する。軽鎖可変領域中の3つの相補性決定領域をまとめて軽鎖相補性決定領域と呼ぶ。

本発明の抗体のCDR配列は必ずしも限定されないが、好ましくはVH CDR1として配列番号1のアミノ酸配列、VH CDR2として配列番号2のアミノ酸配列、VH CDR3として配列番号3のアミノ酸配列、VL CDR1として配列番号4のアミノ酸配列、VL CDR2として配列番号5のアミノ酸配列またはVL CDR3として配列番号6のアミノ酸配列のうち、いずれか1つ以上、好ましくはH鎖の3つ、より好ましくは全てのアミノ酸配列を含有する抗体である。

本発明の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列は必ずしも限定されないが、好ましい抗体として、VHとして配列番号13のアミノ酸配列もしくはVLとして配列番号14のアミノ酸配列のいずれか1つ以上を含有する抗体、またはVHとして配列番号15のアミノ酸配列もしくはVLとして配列番号16のアミノ酸配列のいずれか1つ以上を含有する抗体がある。

【0028】

本発明の抗体は、抗体の定常領域が好ましくはヒト抗体、より好ましくはヒトIgG、さらに好ましくはヒトIgG4由来のアミノ酸配列からなる抗体である。

。本件発明の抗体は特定の分子種に必ずしも限定されるものではない。抗体、すなわち免疫グロブリンの構造は重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）とからなり、重鎖のクラス（ γ 、 α 、 μ 、 δ 、 ϵ ）により5つのイソタイプ（IgG、IgA、IgM、IgD、IgE）に分けられる。このうちIgGとIgAは重鎖の違い（例えばヒトの場合、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ）からサブクラス（例えばヒトの場合IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2）に分けられる。軽鎖は、 κ または λ のいずれかのタイプに分類される。本発明の抗体はクラス、サブタイプまたはイソタイプは限定されず、いずれに分類されるものでもあってもよい。好ましくはイソタイプがIgGの抗体であり、さらに好ましくは補体結合性のないという点においてサブクラスがIgG4の抗体である。

本発明の抗体としては、その活性、例えば、GPVIとの結合能を有する限りにおいて、抗体の断片または一部でもよい。例えば、Fab（fragment of antigen binding）、Fab'、(Fab')₂、一本鎖抗体（scFv）、ジスルフィド安定化抗体（dsFv）、CDRを含有するペプチド等が挙げられる。

【0029】

本発明第3の態様として、本発明の抗体を産生する細胞が提供される。このような細胞の例としては、ハイブリドーマ、形質転換体、または本発明の抗体の遺伝子を導入した遺伝子組換え細胞等がある。抗体を産生するハイブリドーマとしては、具体的にはGPVIに対する自己抗体を産生するヒトから採取した末梢血のリンパ球を用いて作製したハイブリドーマである#2-37細胞（なお、該#2-37細胞は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託され、受託番号FERM P-19400を与えられた）または#2-4細胞がある。また、本発明により上記発明の細胞が産生する抗体が提供される。抗体産生細胞は特定の細胞に限定されないが、好ましくはGPVIに対する自己抗体を産生するヒトの末梢血から採取したリンパ球を用いて作製したハイブリドーマが産生した抗体であり、さらに好ましくは#2-37細胞（受託番号FERM P-19400）または#2-4細胞が産生した抗体である。

【0030】

本発明の第4の態様として、本発明第1または第2の態様の抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。該ポリヌクレオチドは、本発明の抗体のアミノ酸配列をコードするものであれば必ずしも限定されず、ポリヌクレオチドとしては、DNA及びRNAが含まれる。

【0031】

本発明の抗体のCDR配列をコードするポリヌクレオチドは必ずしも限定はないが、好ましくはVH CDR1としてのアミノ酸配列をコードする配列番号17の塩基配列、VH CDR2としてのアミノ酸配列をコードする配列番号18の塩基配列、VH CDR3としてのアミノ酸配列をコードする配列番号19の塩基配列、VL CDR1としてのアミノ酸配列をコードする配列番号20の塩基配列、VL CDR2としてのアミノ酸配列をコードする配列番号21の塩基配列またはVL CDR3としてのアミノ酸配列をコードする配列番号22の塩基配列のうち、いずれか1つ以上、より好ましくはH鎖の3つ、さらに好ましくは全ての塩基配列を含有するポリヌクレオチドであり、また、好ましくはVH CDR1としてのアミノ酸配列をコードする配列番号23の塩基配列、VH CDR2としてのアミノ酸配列をコードする配列番号24の塩基配列、VH CDR3としてのアミノ酸配列をコードする配列番号25の塩基配列、VL CDR1としてのアミノ酸配列をコードする配列番号26の塩基配列、VL CDR2としてのアミノ酸配列をコードする配列番号27の塩基配列またはVL CDR3としてのアミノ酸配列をコードする配列番号28の塩基配列のうち、いずれか1つ以上、より好ましくはH鎖の3つ、さらに好ましくは全ての塩基配列を含有するポリヌクレオチドである。

【0032】

本発明の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは必ずしも限定はないが、好ましくはVHとしてのアミノ酸配列をコードする配列番号29の塩基配列、またはVLとしてのアミノ酸配列をコードする配列番号30の塩基配列のいずれか1つ、より好ましくは両方の塩基配列を含有するポリヌクレオチドであり、また、好ましくはVHとしてのアミノ酸配列をコードする配列番号31の塩基配列、またはVLとしてのアミノ酸配列をコードする配列番号32の塩基配列のいずれか1つ、より好ましくは両方の塩基配列を含有するポ

リヌクレオチドである。

本発明の抗体の定常領域をコードするポリヌクレオチドは、好ましくはヒト抗体、より好ましくはヒト IgG、さらに好ましくはヒト IgG4 由来の塩基配列を含有する。

【0033】

本発明の抗体のヌクレオチド配列を含有する遺伝子を細胞に移入することにより、本発明の抗体を産生する細胞を製造することができる。移入する遺伝子として、好ましくは VH CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 17 の塩基配列、VH CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 18 の塩基配列、VH CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 19 の塩基配列、VL CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 20 の塩基配列、VL CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 21 の塩基配列または VL CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 22 の塩基配列のいずれか一つ以上を含有する遺伝子であり、また、好ましくは VH CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 23 の塩基配列、VH CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 24 の塩基配列、VH CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 25 の塩基配列、VL CDR1 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 26 の塩基配列、VL CDR2 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 27 の塩基配列または VL CDR3 としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 28 の塩基配列のいずれか一つ以上を含有する遺伝子である。また、移入する遺伝子として、好ましくは VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 29 の塩基配列もしくは VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 30 の塩基配列のいずれか 1 つ以上を含有する遺伝子、または VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 31 の塩基配列もしくは VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 32 の塩基配列のいずれか 1 つ以上を含有する遺伝子である。また、移入する遺伝子として、好ましくは VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 29 の塩基配列、および VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 30 の塩基配列を有する遺伝子、または VH としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 31 の塩基配列、および VL としてのアミノ酸配列をコードする配列番号 32 の塩基配列を有する遺伝子、さらに好

ましくは、定常領域がヒト抗体由来のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する遺伝子である。

【0034】

(製法)

本発明の第5の態様として、抗体の生産方法が提供される。この発明の抗体を作成する方法には限定はないが、以下に記載の方法でも作成しうる。すなわち、GPVIに対する自己抗体を産生する患者の末梢血からリンパ球を採取し、体外免疫法で活性化したリンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製する。作製したハイブリドーマが産生する抗体を得て、GPVIとの結合能を有し、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する活性を有する抗体を選択し、この抗体を産生する細胞を得る。この細胞を培養することにより、本発明の抗体を得ることができる。

【0035】

本発明の抗体は、公知の方法（それぞれNature, 312:643, 1984、Nature, 321:522, 1986 以来、多くの方法が開発されている）を用いた組換えヒト抗体としても作製できる。まず、GPVIと特異的に結合する、もしくはGPVIとコラーゲンの結合を抑制する、好ましくは、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する抗GPVIモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、塩基配列およびアミノ酸配列を決定する。次に、取得したVHおよびVLをコードするcDNAを同一細胞又は別のヒト細胞より作製したヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を含有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。動物細胞に導入する遺伝子の作製方法には限定はなく、ハイブリドーマ由来のcDNAから得てもよく、ハイブリドーマのmRNAからPCRによって得てもよく、また化学合成によっても得てもよい。

組換えヒト抗体の作製に用いるヒト抗体の定常領域としては、例えば、ヒト抗体重鎖定常領域としてはC γ 1やC γ 4、ヒト抗体軽鎖定常領域としてはC κ 等の任意のヒト抗体の定常領域を用いることができる。

【0036】

ヒトのCDR配列を含有する抗体は、ヒト体内に天然に存在する抗体の他に、ヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、一本鎖抗体等の抗体の活性断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体の活性断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体の活性断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0037】

本発明は重鎖2本と軽鎖2本からなる抗体のほかに、本発明の抗体の活性断片等も含まれる。抗体の活性断片としては、例えばFab (fragment of antigen binding)、Fab'、F(ab')₂があり、抗体の活性断片をリンカー等で結合したものとして例えば一本鎖抗体 (single chain Fv : scFv) やジスルフィド安定化抗体 (disulfide stabilized Fv : dsFv) があり、抗体の活性断片を含むペプチドとして例えばCDRを含有するペプチドが挙げられる。これらは、本発明の抗体を適当な蛋白分解酵素で処理する方法または遺伝子組換技術等、公知の方法で製造することができる。

【0038】

本発明のFabは、本発明の抗GPVI抗体をIgMの場合はタンパク質分解酵素ペプシンで処理して、IgGの場合はタンパク質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

本発明のF(ab')₂は、本発明の抗GPVI抗体をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

本発明のFab'は、GPVIに特異的に反応するF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。

【0039】

本発明のscFvに含まれるVHおよびVLは、本発明のハイブリドーマが産生する抗体またはヒト抗体のいずれをも用いることができる。本発明のscFvは、本発明の抗GPVI抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のdsFvに含まれるVHおよびVLは本発明の第1または第2の態様の抗体のいずれに由来するものをも用いることができる。

本発明のdsFvは、本発明の抗GPVI抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

【0040】

CDRを含むペプチドは、H鎖またはL鎖CDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明のCDRを含むペプチドは、本発明の抗GPVI抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得した後、CDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

【0041】

本発明の抗体には、例えばハイブリドーマが産生するヒト抗体、EBVを用い

て形質転換した細胞が産生するヒト抗体、cDNAより発現した組換えヒト抗体、またはそれらの抗体の活性断片に放射性同位元素、タンパク質、ペプチドまたは低分子の化合物などを結合させた抗体も含まれる。本発明の抗GPVI抗体または抗体の活性断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体または抗体の活性断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体の活性断片中の糖鎖に放射性同位元素、タンパク質、ペプチドあるいは低分子の化合物などを化学的手法〔抗体工学入門（金光修著1994年（株）地人書館）〕により結合させることにより製造することができる。ハイブリドーマとは、リンパ球と、ヒト、マウス、ラット等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

【0042】

モノクローナル抗体を作製する場合は、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択することが好ましい。ミエローマ細胞は、公知の種々の細胞が使用可能である。これにはヒト由来のSKO-007、ヒトマウスヘテロミエローマであるSHM-D33、マウス由来のP3、P3U1、SP2/O、NS-1、ラット由来のYB2/O及びY3-Ag1, 2, 3等の骨髓腫細胞が含まれる。

ハイブリドーマ作製に用いる細胞としては、必ずしも限定はされないが、ハイブリドーマ作製に用いる複数の細胞のうち少なくとも1種はヒト由来の細胞であることが好ましい。ヒト由来の細胞としては、末梢血、リンパ節または脾臓等のヒトのリンパ球が用いられ、特に自己抗体の産生が確認されているヒトのリンパ球が好ましい。

【0043】

リンパ球の活性化は公知の方法により行なうことができる。例えば、ヒトの末梢血又は脾臓からB細胞を採取し、*in vitro immunization*法により抗原刺激し、ヒトのB細胞由来のミエローマ細胞あるいはマウス由来のミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製する方法、EBVでトランスフォームし、マウスミエローマ細胞と融合させる方法、PWM等のマイトジェンで刺激しB細胞をポリクローナルに活性化し融合させる方法（免疫実験操作法I・II、

右田俊介他編集、南江堂)等が好ましい。

細胞を刺激するために用いる抗原は、必ずしも限定はない。抗原とするタンパク質の由来動物は、抗体の使用目的に応じて適宜選択し得るが、天然物由来のもの、遺伝子工学的に作成したもの、化学的に合成したもの、他のタンパク質やペプチドとの融合タンパク質等、いずれでもよい。例えば血小板、血小板の膜、精製 GPVI、組換え GPVI、GPVI-Fc を用いることができ、好ましくは GPVI-Fc である。

【0044】

活性化リンパ球とミエローマ細胞との融合は、Milstein等の方法(Methods in Enzymol., 73 巻 3頁)等の公知の方法を用いて行なうことができる。例えば、融合剤としてポリエチレングリコール(PEG)を使用する方法(単クローン抗体実験操作法入門、安東民衛・千葉丈／著、講談社)または電気融合法等が挙げられる。免疫細胞とミエローマ細胞との混合比は、それらが融合できる比率であれば限定されないが、活性化リンパ球に対し、ミエローマ細胞を1/10量ないし等量を使用することが好ましい。細胞融合をPEG(平均分子量1,000~4,000)を使用して行なう方法ではPEG濃度は必ずしも限定されないが50%で行なうことが好ましい。また、融合効率促進剤としてジメチルスルフォキシド(DMSO)等の補助剤を添加してもよい。融合は37℃に加温したPEG溶液を混合した細胞に添加することにより開始し、1~5分間反応後、培地を添加することにより終了する。

【0045】

この融合により形成されたハイブリドーマをヒポキサンチン、チミジン及びアミノプテリンを含む培地(HAT培地)等の選択培地で1日~10日間培養し、未融合細胞と分離する。得られたハイブリドーマをその産生する抗体により更に選択する。選択したハイブリドーマを公知の限界希釈法に従って単クローン化し、単クローン性抗体産生ハイブリドーマとして樹立する。

ハイブリドーマの産生する抗体の活性を検出する方法は公知の方法を使用することができる。ここで抗体の活性は、第一段階として、GPVI抗原への結合能を、第二段階として、GPVIとコラーゲンの結合を阻害する活性を検出する。

第一段階の活性の検出方法としては、例えばELISA法、ウェスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ法が挙げられる。第二段階の活性の検出法としては、例えばELISA法（結合阻害型）、タンパク相互作用解析法（BIACORE等）、血小板凝集抑制測定法が挙げられる。

樹立したハイブリドーマを公知の方法で培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を得ることができる。

【0046】

抗体の精製は、塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法またはアフィニティークロマト法等の公知の精製手段を用いて行うことができる。

抗体の濃度は公知のタンパク質の定量方法、例えば280nmにおける吸光度の測定により測定することができる。

【0047】

本発明の抗GPVI抗体の抗原結合性を確認する方法、または本発明の抗GPVI抗体を用いて生物試料中のGPVIを検出する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法(ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CSA法等)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法[単クローン抗体実験マニュアル(講談社サイエンティフィック、1987年)、続生化学実験講座5免疫生化学研究法(東京化学同人、1986年)]などを用いることができる。

本発明の抗体の、例えばコラーゲンのような血小板凝集を惹起させる物質によるヒト血小板凝集へ及ぼす影響の測定方法は、必ずしも限定はされず、常法により行うことができる。具体的には、ヒト血小板浮遊液に本発明の抗体を添加し、その後コラーゲンを添加し、血小板凝集能測定装置等で凝集率を測定する。

抗体単独でのヒト血小板凝集を測定する方法は必ずしも限定されず、常法により行うことができる。具体的には、ヒト血小板浮遊液に本発明の抗体を添加し、血小板凝集能測定装置等で凝集率を測定する。

【0048】

(用途)

本発明の抗体は、ヒト GPVI に特異的に結合するものであり、本発明の抗体、抗体の活性断片、化学物質と結合させた抗体の修飾物、またはこれらの混液を含む組成物等は、ヒトの疾患の予防、診断および治療の用途、また被験試料、細胞および組織等のヒト GPVI の検出の用途等を含めて、種々の用途がある。

特に、本発明の抗体の一態様としては、抗体単独ではヒト血小板の凝集を起こさないものであるから、抗体の活性断片だけでなく抗体自体もヒト血小板の凝集を抑制し、活性断片とせず抗体そのものをヒトに投与して、ヒトの疾患の予防、診断および治療等に用いることができる。

【0049】

用途：医薬

本発明の抗体は GPVI への結合の特異性が高く、かつヒト由来であって、好ましくは中和活性を有し、さらに好ましくはヒト血小板の凝集を抑制する作用を有することから、特に、ヒトの疾患、例えば、血小板の活性化もしくは凝集、または血管内皮障害もしくは動脈硬化性の反応によって引き起こされる疾病の予防及び／または治療に有効であり、また、血栓もしくは塞栓に起因する疾患、例えば、血栓症及び塞栓症等の予防及び／または治療に利用することができる。これらの疾患には、動脈性血栓症のみならず、静脈性血栓症も含まれ、また、心房細動に起因する脳梗塞も含まれる。

本発明の抗体により予防及び／または治療が可能なヒトの疾患または病態としては、具体的には、心筋梗塞、血栓溶解療法時、経皮的冠静脈内腔拡張術施行時、ステント施行時、バイパス手術施行時もしくは人工血管施行時の、またはこれらの後の血管内皮肥厚、血管再狭窄、狭心症もしくは心筋梗塞、心房細動もしくは心房粗動及びこれらに起因する血栓症、塞栓症もしくは脳梗塞、閉塞性血栓性血管炎、急性動脈閉塞症、閉塞性動脈硬化症または深部静脈血栓症等があり、脳梗塞（アテローム性血栓性梗塞、ラクナ梗塞、心原性梗塞）、一過性脳虚血発作、くも膜下出血後の脳血管攣縮、肺血栓、肺塞栓症、血管性紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、播種性血管内凝固症候群、体外循環時での血液凝固防止、全身性エリテマトーデス、多発性動脈炎、抗リン脂質抗体症候群、紫斑病性腎炎、糖尿病に伴う内皮細胞傷害、糖尿病性腎炎、糖尿病性

網膜症、腎塞栓、移植治療に伴う合併症（肝静脈閉塞症、移植片対宿主病）等が挙げられる。

【0050】

本発明の抗体は、また、先述の予防及び／または治療対象の疾患に対して、単独で投与されるか、あるいは他の薬理活性成分と併用されることもできる。かかる薬理活性成分とは、例えば公知の血栓溶解剤（例えば組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）ならびにそれらの誘導体（改変体あるいはいわゆる第二世代といわれるものも含む）、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ）、あるいは公知の抗血小板薬（例えばアスピリン、チクロピジン、クロピドグレル、トロンボキサンアンタゴニスト、トロンボキサン合成阻害剤、GPIIb/IIIaアンタゴニスト）、公知の抗凝固薬（例えばワーファリン、ヘパリン、低分子ヘパリン、ペンタサッカライド、トロンビン阻害剤、FXa阻害剤、FVIIa阻害剤）など

が挙げられる。ここで併用とは、本発明の抗体と、当該薬理活性成分とをともに含む合剤を投与する他、本発明の抗体と当該薬理活性成分とがそれぞれ別個の製剤として一時期にもしくは時間をずらして投与される場合をも含み、患者の血中において同時に存在する限りにおいて投与の形態は問われない。

【0051】

本発明の抗体ならびに製剤学的に許容される組成物を有効成分として含有する医薬品は、通常用いられる製剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて例えば錠剤、注射剤、散剤、坐剤等に調製され、人間その他の動物に対して投与される。

ヒトに適用する場合、その投与経路は、経口投与、静脈内投与（ボラス投与、連続点滴、間欠的点滴）、皮下投与、筋肉内投与、関節内投与、経皮投与、経鼻投与等があるが、通常、経口投与または静脈内投与である。本発明の抗体のヒトに対する臨床投与量は適用される患者の症状、体重、年齢や性別等を考慮して適宜決定されるが、通常成人一日あたり、静脈内投与で1～10000mg、好ましくは10～1000mgであり、これを1回あるいは数回にわけて投与する。投与量は種々の条件で変動するので、上記投与量範囲より少ない量で十分な場

合もある。

ここで、本発明の抗体はG PVIを認識する点で共通するものの、本発明は異なる機序を有する多様な抗体を包含するものである。例えば、G PVIとコラーゲンの結合を直接阻害する、またはG PVIを切断することにより血小板の活性化及び／または凝集を抑制する抗体は比較的即時的な効果を期待できるので、少なくとも疾患の急性期（例えば、心筋梗塞時もしくはP T C A実施時またはそれらの直前もしくは直後）において有用である可能性がある。このような場合には、好ましくは血中の血小板表面のG PVIの大部分に本発明の抗体を結合させるために比較的大量の抗体を投与、例えば、単回もしくは分割静注または点滴静注することができる。また、G PVIを内部に取り込ませる抗体は即時的効果は期待できないかもしれないが、ヒト血小板の血中での寿命（9～10日前後）及びヒト抗体の血中半減期（I g Gの場合、数週間）を考慮すると持続的な効果が期待できるので、例えば、疾患の慢性期（例えば、心筋梗塞発症後またはP T C A実施後数日～数ヶ月）において有用である可能性がある。このような場合には、血中の血小板のコラーゲンに対する反応性を部分的に、好ましくは完全に、阻止する程度に血小板表面のG PVIを焼失させるために必要な量の抗体を比較的間隔を置いて、例えば、1クールを数日から数週間として、投与、例えば、単回もしくは分割静注または点滴静注することができる。従って、好ましい態様において、本発明の抗体はこれらの効果を併せ持っても良い。また、それぞれの効果が期待できる抗G PVI抗体を複数組み合わせ合わせた治療を実施しても良い。

【0052】

非経口投与のための組成物は、通常、許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解された免疫グロブリンの溶液又はその混液を含む。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、リン酸塩緩衝生理食塩水（P B S）、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒトアルブミン溶液等が用いられ得る。これらの溶液は、無菌であり、そして一般的には微粒子物質が存在しない。これらの組成物は、慣用の、良く知られた滅菌方法により滅菌されうる。組成物は、生理学的条件に近づけるために、要求に応じて、薬学的に許容できる補助物質、例えばp H調節及び緩衝化剤、毒性調節剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウ

ム、塩化カルシウム及び乳酸ナトリウムを含みうる。これらの製剤中の抗体の濃度は、広範囲に、即ち、約 0.005 重量%未満（通常は、少なくとも約 1 重量%）から 15 又は 20 重量%と大きい量まで変化することができ、主として、選択された投与の特定の様式に従って、液容量、粘性等に基づいて選択される。

【0053】

非経口投与組成物を調製するための現実の方法は、本技術分野の熟練者にとって公知又は明白であり、例えば、レミントンズ ファーマシューティカルサイエンス（第 15 版、マック パブリッシング カンパニー、イーストン、ペンシルバニア、1980）（本引例をもって本明細書の一部と成す）に更に詳細に記載されている。洗浄（lavage）又はその他のルートのために適した組成物は、意図される特定の使用に従って選択される。いくつかの薬学的組成物は、抗 GPVI 抗体及びその疾患に於いて常用される他の治療剤を含みうる。いずれの場合も、ボラス投与および持続投与が適用されうる。また、予防的または治療的有效量は、対象疾患、病態および患者の状態等によって適宜決定される。

【0054】

本発明の抗体は、貯蔵のため凍結又は凍結乾燥され、使用に先だって適当な担体中で再構成されうる。この技術は、慣例の免疫グロブリンにおいて有効であると知られており、公知の、凍結乾燥及び再構成技術が用いられ得る。凍結乾燥及び再構成が、様々な程度の抗体の活性損失をもたらしうる（例えば、慣例の免疫グロブリン、IgM 抗体は、IgG 抗体よりも大きい活性損失を生じる傾向にある）ということ、及び使用レベルが、それを補うために調節されなければならないかもしれないということは、当業者にとって認識されることである。

【0055】

用途：GPVI 検出

本発明の抗体または抗体の活性断片を用いて、被検試料中の GPVI を検出する方法は、被検試料と本発明の抗体または抗体の活性断片を接触させる工程、本発明の抗体または抗体の活性断片に結合した被検試料中の GPVI を検出する工程を含み得る。被検試料中の GPVI を定量する工程を更に含んでも良い。被検試料中の GPVI を検出する方法により、疾患の診断を行うことができる。特に、ヒ

トの疾患、例えば、血栓性、塞栓性または動脈硬化性の疾患の診断に利用することができる。

本発明の抗体を用いて、被検試料中の G P V I を検出する方法としては、サンドイッチ E L I S A 系、インヒビション E L I S A 系、蛍光抗体法、免疫組織化学染色法、放射性物質標識免疫抗体法、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法などがあげられるが、これらに限定されるものではない。対象となる被検試料は限定されないが生物試料が用いられ、動物、特にヒトの体液あるいは、組織、細胞および菌体ならびにそれらの抽出液、培養上清、塗末標本および切片が挙げられるが、血小板であることが好ましい。

【0056】

本発明の抗体または抗体の活性断片を用いて、G P V I 又は血小板上の G P V I のコラーゲンに対する結合を阻害する方法は、G P V I 又は血小板上の G P V I と本発明の抗体または抗体の活性断片を接触させる工程、G P V I 又は血小板上の G P V I とコラーゲンを接触させる工程、本発明の抗体または抗体の活性断片による G P V I 又は血小板上の G P V I のコラーゲンに対する結合を阻害する工程の少なくとも一つを含み得る。

本発明の抗体または抗体の活性断片による G P V I 又は血小板上の G P V I の血小板凝集に対する阻害作用を検出する工程は、前述の *in vitro* アッセイ系の他、*in vivo* アッセイ系を用いることも可能である。ここでいう *in vivo* アッセイ系とは、生体に本発明の抗体または抗体の活性断片を投与し、当該抗体または抗体の活性断片が生体の機能やステータスに与える影響を検出する評価系を意味する。たとえば、コラーゲン投与モデル動物に本発明の抗体または抗体の活性断片を投与し、病態の重篤度の指標に与える影響を評価する系が例として挙げられる。

【0057】

【実施例】

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は、当該分野における慣用略号に基づくものである。

【0058】

実施例 1 ヒト可溶性GPVI-Fcの作製

in vitro immunization用の抗原及びスクリーニング用抗原として用いるため、ヒトGPVIの細胞外ドメインとヒトIgGのFcフラグメントとの融合蛋白質 (GPVI-Fc) を作製した。なお、DNA 操作は特に断りのない限り、モレキュラークローニング第二版 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed., Joseph S., et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)) にしたがって行った。

【0059】

GPVI-Fc発現プラスミドは、以下の手順により遺伝子工学的に作製した。まず、江角らがクローニングしたヒトGPVI cDNAを組込んだプラスミドpBK-CMV-GPVI-1 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000 Oct 14;277(1):27-36) を鋳型とし、センスプライマー 1 (配列番号 33。5'末端側に制限酵素Xba I 認識配列を含む) およびアンチセンスプライマー 1 (配列番号 34。5'末端側に制限酵素Bam H I 認識配列を含む) を用いてPCR を行い、ヒトGPVI細胞外ドメイン (269 アミノ酸) をコードするcDNA を得た。一方、ヒトIgG₁FcドメインcDNA が含まれるプラスミドpM1304 (W097/42319に記載) を鋳型としPCR を行い、あらためてGPVI細胞外ドメインにインフレームで連結可能となるヒトIgG₁Fcドメイン (506 アミノ酸) をコードするcDNA を得た。このPCRのためのセンスプライマー 2 (配列番号 35) は、ヒトIgG₁FcドメインN 末端側をコードするcDNA 配列を含み、さらにその5'末端側に制限酵素BamH I 認識配列を配置して設計し、またアンチセンスプライマー 2 (配列番号 36) はヒトIgG₁FcドメインC 末端側に制限酵素KpnI認識配列を配置して設計したものを使用した。PCRにより得られた二つのcDNA断片を制限酵素で処理した後、哺乳動物細胞を宿主とする発現プラスミドであるpCAGGS (特許第2824434号公報) のクローニング部位に挿入した。すなわち、ヒトGPVI細胞外ドメインをコードするcDNA断片は制限酵素Xba I およびBamH I で切断し、ヒトIgG₁FcドメインをコードするcDNA断片は制限酵素BamH I およびKpnIで切断した。pCAGGSのクローニング部位にはリンカーを挿入し、適当な制限酵素切断部位 (Xba I、KpnI) を付加した後に、ヒトGPVI細胞外ドメインをコードするcDNAお

よびヒトIgG₁FcドメインをコードするcDNAがインフレームで連結させて挿入した。この工程を図1に示す。

【0060】

得られた発現プラスミド (pCAGGS-GPVI-Fc) を基にバキュロウイルスへのトランスファーベクターおよび組換えウイルスを作製し、カイコ蛹での発現を行った。すなわち、pCAGGS-GPVI-Fcを制限酵素Xba I およびHind IIIで切断することによりGPVI-FcをコードするDNA断片を切り出し、その末端をBlunting Kit (TAKARA) を用いて平滑末端とした。そのDNA断片をバキュロウイルスへのトランスファーベクターであるpYNGのSma I 部位に挿入し、ポリヘドリンプロモーターに対して正方向で挿入されているクローン (pYNG- GPVI-Fc) を選択した。この工程を図2に示す。そのクローンを基に組換えウイルスを作製し、ウイルス感染細胞でのGPVI-Fc蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで確認した。最終的に作製したウイルス溶液をカイコ蛹に接種することにより、GPVI-Fcの発現を行った。

その結果、カイコ蛹磨碎液中に十分な量のGPVI-Fcの発現が認められ、その磨碎液をプロテインAカラム (Prosep-A、ミリポア) に供することによりGPVI-Fcの精製を行った。

【0061】

実施例2 抗GPVI自己抗体を有するヒトの末梢血リンパ球を用いた抗GPVIモノクローナルヒト抗体の作製

抗GPVIモノクローナルヒト抗体はGPVIに対する自己抗体を有していることが確認されている供血者のリンパ球とミエローマ細胞を融合し、以下のように調製した。まず、書面にて同意を得た供血者から無菌的に採血したヘパリン加血液6mlを、Ficoll-Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB) を3ml加えたLeucosep (Greiner) に重層し、1000gにて遠心し、リンパ球分画を回収した。得られたリンパ球分画をダルベコPBS (以下、D-PBSと記載する場合がある) にて800gで2回遠心洗浄後、10%FCS (ウシ胎児血清) を含むHybridoma-SFM (Invitrogen) に懸濁し、 7.4×10^7 個の細胞を得た。

【0062】

前記リンパ球分画に、PHA-L (Sigma) を $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、LPS (DIFCO) を $20 \mu\text{g/ml}$ 、実施例1記載の精製GPVI-Fcを $10 \mu\text{g/ml}$ となるようにそれぞれ添加し、細胞濃度は 1×10^6 個/ml となるように調製し3日間培養しリンパ球の活性化を行った。なお、培養時に、さらにIL-4 (PeproTech) を 400 U/mL を添加し、また、培養期間を8日間にする等、適宜条件を微調整し、リンパ球の活性化を試みた。細胞融合は安藤ら(単クローン抗体実験操作法入門、安東民衛・千葉丈/著、講談社)にしたがい、活性化したヒトリンパ球とマウスミエローマ細胞 (SP2/O-Ag14、ATCC CRL1581) を4:1で混合し50%ポリエチレングリコール (Sigma) により細胞を融合した。融合後、10%FCS、 $1 \times \text{HAT}$ (Invitrogen) を含むHybridoma-SFMに懸濁し、10日間培養後に、増殖したハイブリドーマの培養上清をサンプリングし、目的の抗体を産生しているハイブリドーマをELISA法によりスクリーニングした。

【0063】

すなわち、精製GPVI-Fcを1ウエルあたり $0.25 \mu\text{g}$ 添加して固相化したイムノプレート (Maxisorb、NUNC) にハイブリドーマの培養上清 $50 \mu\text{L}$ を添加し 37°C で1時間反応した。対照としてヒト精製Fc (Athens Research And Technology, Inc.) を同様に固相化したウエルを調製し、培養上清を添加し反応させた。反応終了後、各ウエルを洗浄し、次にペルオキシダーゼ標識抗ヒトカップ抗体 (DAKO、P129) またはペルオキシダーゼ標識抗ヒトラムダ抗体 (DAKO、P130) を各ウエルに添加した。 37°C 1時間反応後、同様に洗浄し、TMB発色液 (BioFix) を各ウエルに添加し10分反応後、 0.5 M 硫酸溶液を添加し反応を停止した。続けてプレート吸光度計により 450 nm の吸光度を測定し、精製ヒトFcでは吸光度が上昇せず、GPVI-Fcを固定化したウエルのみで吸光度が上昇する、すなわち抗GPVI抗体を産生しているハイブリドーマが存在するウエルを選択した。

【0064】

さらに、限界希釈法により培養を行い単一クローンを得た。すなわち、10日

間培養後の培養液について前記と同様にスクリーニングを行い、抗GPVIモノクローナルヒト抗体を産生するハイブリドーマを得た。

選択したハイブリドーマを10%FCSを含むHybridoma-SFMで培養後、無血清化し抗体を産生させた。IgM抗体はマニュアルに従いProsep-ThiosorbMカラム(MILLIPORE)により精製し、IgG抗体はProsep-Aカラム(MILLIPORE)を用いて精製した。精製抗体は0.076Mリン酸緩衝液(PBS)(pH6.4)で透析し、280nmの吸光度より濃度を算出した。

【0065】

実施例3 作製した抗GPVIモノクローナルヒト抗体のタイピング

実施例2で得られた抗体のタイピングはHuman IgG Subclass Profile ELISA Kit (Zymed Laboratories) 及びウエスタンブロッティングにより行った。ELISAはマニュアルに従い、抗体の希釈液をサンプルとして使用した。キットで検出されなかった抗体は、それぞれ約1 μ gを4~20%のSDS-PAGEにより分離後、PVDF膜(MILLIPORE)に転写し、ウエスタンブロッティングを行った。すなわち、PVDF膜をブロッキング後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgM抗体(P0322、DAKO)と反応した。洗浄後、ECL試薬(Amersham Pharmacia Biotech AB)と反応させ、ライトキャプチャ(ATTO)により反応するバンドを検出した。得られた抗GPVI抗体のタイピング結果を表1に示した。

なお、表1中にクローン番号#2-37として示される細胞は、平成15(2003)年6月18日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM P-19400として寄託されている。

【0066】

【表 1】

タイピング結果

(1) PHA-LおよびLPS存在下で、 3日間培養した場合	
クローン番号	サブクラス
#2-4	IgM/λ
#2-6	IgM/λ
#2-7	IgM/λ
#2-16	IgM/κ
#2-37	IgM/λ
(2) PHA-L、LPSおよびIL-4 存在下で、8日間培養した場合	
クローン番号	サブクラス
#4-1	IgG2/λ
#4-7	IgG2/λ
#4-28	IgM/κ
#4-43	IgM/λ
#4-44	IgM/λ
#4-45	IgM/λ
#4-52	IgM/λ
#4-56	IgM/κ
#4-62	IgM/λ
#4-65	IgM/λ
#4-68	IgM/κ

【0067】

実施例 4 抗GPVIモノクローナルヒト抗体のGPVI結合活性の測定 (ELISA法)

実施例 2 で得られた精製抗体の GPVI 結合活性を、実施例 2 に記載の ELISA 法にて測定した。実施例 2 においてハイブリドーマの培養上清の代わりに、実施例 2 で調製した精製抗 GPVI モノクローナルヒト抗体 20 ng を添加し、対照として精製ヒト IgM (Cappel) を使用した。

その結果、図 3 に示すように対照として使用したヒト IgM では吸光度が上昇しないのに対し、選択されたハイブリドーマの産生する精製抗 GPVI モノクローナルヒト抗体では、いずれも顕著な吸光度上昇が認められ、調製した抗体が特異的に GPVI を認識していることが確認された。

【0068】

実施例 5 抗GPVIモノクローナルヒト抗体によるGPVI-Fcのコラーゲンへの結合抑制の検討

実施例 2 で得られた抗体が特異的に GPVI とコラーゲンとの結合を阻害していることを確認する目的で蛋白相互作用解析装置 (BIACORE 3000) を用いた解析を行った。まず、ヒトコラーゲン Type I (生化学工業) を BIACORE 社のマニュアルに従い、CM5 チップ (BIACORE) 上にコラーゲンを 6303 RU (Resonance Unit) 固定化した。ここで RU は BIACORE 装置で使用するレスポンスを表す単位であり、1000 RU は約 1.2 ng の物質が結合したことを示す。GPVI-Fc と、精製ヒト IgM または精製 #2-37 抗体とをそれぞれ 50 μ g/ml となるように混合し、コラーゲン固定化チップにインジェクトした。図 4 (A) に示すようにコラーゲンと GPVI-Fc との結合は精製ヒト IgM 抗体では阻害されないのに対し、図 4 (B) に示すように #2-37 抗体は濃度依存的にコラーゲンと GPVI-Fc の結合を阻害し、IC₅₀ は 8.1 μ g/ml と算出された。

【0069】

実施例 6 ヒト血小板凝集能に及ぼす抗体の影響

文書により同意を得た健常人より採血した血液から常法 (Takayama H et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 174, pp.922-927 (1991)) に準じて血小板を調製し、終濃度約 $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 個/mL で使用した。血小板凝集能の測定は、Ezumi Y et al. (Blood, 99, pp.3250-3255 (2002)) に準じて以下のように実施した。被検物質である実施例 2 で得た抗体またはその溶媒を添加した後、37 °C で 5 分間インキュベートした。さらに CaCl₂ 溶液を終濃度で 1 mM となるように添加し、37 °C で攪拌しながら 3 分間インキュベートした。コラーゲン (NYCOMED PHARMA GMBH) の溶液を終濃度で 3 ないし 4 μ g/mL となるように加え、血小板凝集能測定装置 (興和株式会社 PA-200) にて光透過率を経時的に測定する事により、抗体のコラーゲン惹起血小板凝集抑制作用を測定した。その結果を表 2 に示した。なお、血小板凝集の測定結果は、光透過率が最大となった時点での透過率 (最大凝集率) で表した。

【0070】

次に、コラーゲンの代わりに血小板凝集惹起物質としてヒトトロンビン (Sigma) を0.3単位/mLの濃度になるように添加し、同様に抗体の血小板凝集へ及ぼす影響を測定した。その結果、10 μ g/mLの抗体濃度における最大凝集率は、#2-37抗体の場合は91%であり、#2-4抗体の場合は96%であった。

さらに、前記の測定において、コラーゲン等の血小板凝集惹起物質を添加せずに、被検物質 (抗体) 単独での血小板凝集惹起作用を測定した結果、10 μ g/mLの抗体濃度における最大凝集率は、#2-37抗体の場合は2%であり、#2-4抗体の場合は3%であった。

以上の結果から、#2-37抗体および#2-4抗体はいずれも、単独で血小板凝集惹起作用は有さず、コラーゲンによる血小板凝集のみを特異的に抑制する事が観察された。

【0071】

【表2】

(A) #2-37抗体

抗体終濃度	最大凝集率 (コラーゲン 3 μ g/mL)
対照	67%
0.01 μ g/mL	16%
0.03 μ g/mL	15%
0.1 μ g/mL	11%

(B) #2-4抗体

抗体終濃度	最大凝集率 (コラーゲン 4 μ g/mL)
対照	77%
0.1 μ g/mL	63%
0.3 μ g/mL	49%
1 μ g/mL	27%

【0072】

実施例7 抗GPVIモノクローナルヒト抗体の解離定数の測定

実施例6で血小板凝集抑制活性が確認された抗体の解離定数を蛋白相互作用解析装置(BIACORE3000)を用いて測定した。実施例1記載の精製GPVI-FcをBIACORE社のマニュアルに従い、CM5チップ上に固定化した。#2-4抗体についてBIACORE3000のWizard Programにて測定し、BIACORE社のBIAevaluationソフトを用いて解析したところ、#2-4抗体の解離定数(K_d)は $4.13 \times 10^{-8} \text{M}$ と算出された。

【0073】

実施例8 抗GPVI抗体のCDRアミノ酸配列の決定

実施例2のELISA法によるスクリーニングにて選択されたハイブリドーマを実施例2に従って培養した。細胞濃度が 2×10^5 個/mlになった段階で培養液を回収し、回収した細胞よりTRIzol (Invitrogen)を用いてmRNAを抽出した。次に、Superscript First-strand synthesis System II (Invitrogen)のマニュアルに従って、mRNAからオリゴdTプライマーにより一本鎖cDNAを合成した。論文(J. Immunol. Methods 1995 Feb 27;179(2):203-14 および J. Mol. Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97)の情報を参考にして重鎖および軽鎖可変領域を増幅させるPCRプライマー(配列は表3に記載)を合成し、先に調製したハイブリドーマ由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行った。増幅されたDNAのバンドを2%アガロースを用いて確認後、PCR産物をスピンカラム(Sigma)を用いて精製した。精製されたPCR産物とpT7BlueTベクター(Novagen)を混和し、Ligation kit verII (TAKARA)を用いて16℃、30分でライゲーション反応を行った。その反応液を用いてコンピテントセルE. coli (JM109、TAKARA)にトランスフォーメーションを行い、X-Gal、IPTGを含むLBプレートに播種し、1晩培養した。出現した白コロニーをピックアップし、Ex Taq polymerase (TAKARA)、U-19mer primer (配列は表3に記載)、T7 promoter primer (配列は表3に記載、Novagen)を用いて、コロニーダイレクトPCRでインサートがベクターに挿入されて

いることを確認した。次に、インサートが確認されたコロニーをLB培地で一晚培養し、QIAGEN plasmid mini kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミドはU-19mer primer、T7 promoter primerを用いてDYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (アマシヤムバイオサイエンス) により反応後、シークエンサーABI PRISM3100 (アプライドバイオシステムズ) を用いて解析を行った。

【0074】

決定したCDR配列を表3に示した。なお、#2-4のクローンのVL CDR3をコードする塩基配列(配列番号28)のうち31番目のグアニンは実際には検出されていないが、他のクローンの解析結果よりグアニンであることが予想される。この予想に基づいて、#2-4のクローンのVL CDR3(配列番号12)およびVL CDR(配列番号16)のアミノ酸配列を記載している。

【0075】

【表3】

プライマー	配列 (配列番号)
PCRプライマー: #2-37 VH 5'	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (37)
PCRプライマー: #2-37 VH 3'	TGAGGAGACGGTGACCCAGGGTTCC (38)
PCRプライマー: #2-4 VH 5'	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (39)
PCRプライマー: #2-4 VH 3'	TGAGGAGACGGTGACCCAGGGTTCC (40)
PCRプライマー: #2-37 VL 5'	CACTCTGCOCTGACTCAGCCGGC (41)
PCRプライマー: #2-37 VL 3'	AGAGGAGGGTGGGAACAGAGTGAC (42)
PCRプライマー: #2-4 VL 5'	CAGTCTGTCTTGACGCAGCCGGC (43)
PCRプライマー: #2-4 VL 3'	AGAGGAGGGTGGGAACAGAGTGAC (44)
U-19mer primer	GTTTTCCAGTCACGACGT (45)
T7 promoter primer	CTAATACGACTCACTATAGG (46)

【0076】

【表4】

クローン 番号	重鎖 (H 鎖)		
	CDR1 (配列番号)	CDR2 (配列番号)	CDR3 (配列番号)
#2-4	SYAMS (7)	AISGSGSTYYADSVKG (8)	HFILTYHY (9)
#2-6	NYAMA (47)	AISVSGTSTAYADSVKG (48)	RGLPHPKYFCDS (49)
#2-7	SNYMS (50)	VIYSGGS-TYYADSVKG (51)	LKADHYDSLAPDFDY (52)
#2-16	SYDMH (53)	AIQTAGD-TYYPGSVKG (54)	AGKMFWRGAFDI (55)
#2-37	DYYMS (1)	YITSSSYTNYADSVKG (2)	DRAVRGVIIIRPPDY (3)
#4-1	SYAMS (56)	AITGSGGTTYADSVKG (57)	GGYTSGNSYFDY (58)
#4-7	TFYIH (59)	FINPSGVNTNYAQKFD (60)	DTRGWSLNGLDV (61)
#4-28	DYAMH (62)	LINGDGGQTHYADSVKG (63)	GKRSCTYNGLEY (64)
#4-36	DYYMS (65)	FISSSSGYTDYADSVKG (66)	RSSGFPFDL (67)
#4-43	SNYMS (68)	VIYSGSGTYYADSVKG (69)	GRWSYDY (70)
#4-44	DYYMS (71)	YISSSSYTNYADSVKG (72)	TLYSGSGSDAFDI (73)
#4-45	DYCMS (74)	GINWNGSGTGYADSVKG (75)	AVATDAFDI (76)
#4-52	SYWMH (77)	RINSOGSSTSYADSVKG (78)	DLSPGSGSPFDY (79)
#4-54	TSQVGVG (80)	PIYVNDKRYSPSLKS (81)	REIAAAGLYAFDI (82)
#4-56	DYAMH (83)	LISGDDGSGTYYADSVKG (84)	GSYDSSGYYPGAFDI (85)
#4-62	DYCMS (86)	GINWNGSGTGYADSVKG (87)	GPTIAGYYYGMDV (88)
#4-64	NYAMH (89)	VISPDGRSKYYADSVRG (90)	EIGASYGSGGTPGY (91)
#4-65	SYWMS (92)	RIYTSGSTNYNPSLKS (93)	DLAARNWFLP (94)
#4-68	SYAMS (95)	AISGSGSTYYADSVKG (96)	NLPAPGYCSSTSCYALYYYYGMDV (97)

クローン 番号	軽鎖 (L 鎖)		
	CDR1 (配列番号)	CDR2 (配列番号)	CDR3 (配列番号)
#2-4	SGSSSNIGNNYVS (10)	DNNKRPS (11)	GTWSSLSAGV (12)
#2-6	TGTSSDIGAYDFVS (98)	DVRNRPS (99)	SSPTTSSVWV (100)
#2-7	TGTSSDVGGYNYVS (101)	EVSKRPS (102)	SSYAGSNMGV (103)
#2-16	未決定	未決定	未決定
#2-37	TGTSSDVGGYNYVS (4)	DVSNRPS (5)	SSYTSSSTLV (6)
#4-1	欠失	WASTRES (104)	QYYRFPPLT (106)
#4-7	SGRSSNIESNNVY (106)	SSNQRPS (107)	AAWDDSLSGQV (108)
#4-28	KSSQSVLYSSNKKNYLA (109)	WASTRES (110)	QYYSTPLT (111)
#4-36	未決定	未決定	未決定
#4-43	SGSSSNIGNNYVS (112)	DNNKRPS (113)	GTWSSLSAGV (114)
#4-44	SGDKLGDYAC (115)	QDSKRPS (116)	QAWDSSTYV (117)
#4-45	GGNIGSKNVH (118)	RDSNRPS (119)	QVWDSSTACGV (120)
#4-52	QGDLSRYYAS (121)	GKNNRPS (122)	NSRDSGSHLV (123)
#4-54	TGTSSDVGGYNYVS (124)	EVTKRPS (125)	CSYAGSYIFL (126)
#4-56	RASQSISSWLA (127)	KASSLES (128)	QQYNSYPYT (129)
#4-62	TGTSSDVGGYNYVS (130)	EVSKRPS (131)	SSYAGSNLYV (132)
#4-64	RASQSVSRVLA (133)	DASNRA (134)	QQRSHWQPLT (135)
#4-65	SGSSSNIGNNYVS (136)	DNNKRPS (137)	GTWSSLSAYV (138)
#4-68	RASQSISSVLA (139)	AASSLQS (140)	QSYSTPLT (141)

【0077】

実施例9 遺伝子組替えによるヒト抗体の生産

(1) 組換えヒトIgG発現プラスミドの構築

データベース情報を参考にヒトIgG重鎖遺伝子の翻訳開始コドンのATGを含むようなセンスプライマーおよび翻訳中止コドンを含むアンチセンスプライマーを製作し、Human Spleen 5' - Stretch cDNA Library (

クローンテック社製) を鋳型としてPCRを行う。増幅したDNA断片をヒトIgG遺伝子をpT7Blue (Novagen) に組み込み塩基配列を確認する。ヒトIgG遺伝子の内部を切断しない適切な制限酵素によりヒトIgG遺伝子をpT7Blueから切り出した後、発現プラスミドであるpCAGGSのクローニング部位に挿入し、ヒトIgG重鎖発現プラスミドの構築を行う。なお、ヒトIgG軽鎖発現プラスミドの構築も重鎖の場合と同様の方法で行う。

【0078】

(2) 抗体遺伝子のクローニング

ハイブリドーマ#2-37を培養し、細胞を調製する。得られた細胞をD-PBS (Sigma) で洗浄後、total RNAをTRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて単離精製する。次にOligo-dTプライマーとSuperScriptII system (Invitrogen) を用いて一本鎖cDNAを合成する。重鎖および軽鎖可変領域を増幅させるPCRプライマーを合成し、ハイブリドーマ由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行う。増幅したDNA断片をpT7Blue (Novagen) に組み込み塩基配列の確認を行う。

【0079】

(3) ヒト-ヒトキメラ抗体発現プラスミドの構築

ヒトIgG遺伝子の重鎖可変領域を切り出すことができる適当な制限酵素を用いて重鎖可変領域を切り出し、ハイブリドーマ由来重鎖可変領域と置き換える。この時、ハイブリドーマ由来重鎖可変領域のDNA断片は、挿入する制限酵素切断部位と同じ配列を含むプライマーによりPCRで増幅させる。ハイブリドーマ由来軽鎖可変領域を有する組換えヒトIgG発現プラスミドの構築も重鎖の場合と同様の方法で行う。

【0080】

(4) ヒト-ヒトキメラ抗体産生クローンの選択

CHO (CCL-61) 又はSP2/0-ag14 (ATCC CRL1581) に導入し、培養後上清に産生される目的抗体をGPVIに対する結合活性により選択する。具体的には、まず、キメラ抗体重鎖発現プラスミド、軽鎖発現プラスミド、pSV2-neoをそれぞれ4 μ g (計12 μ g) とトランスフェクション試薬であるFuGENE6 (ロシュ・ダイアグノステイクス) 60 μ gを混合し、しばらく清置する。次に培養面積150cm²の培養用フラ

スコにおいてセミコンフルエントの状態まで培養した細胞の培養液中にプラスミドとFuGENEの混合液を添加する。2、3日の培養後、細胞を96wellマイクロプレートに0.7個/wellとなるように播種し、0.2 mg/ml G-418を含む培地にてさらに2、3週間の培養を行う。コロニーが形成されたwellから培養上清を回収し、EI AにてGPVIとの結合活性を調べ、結合活性を有するクローンを得る。

【0081】

(5) ヒト-ヒトキメラ抗体の産生

ヒト-ヒトキメラ抗体産生クローンを血清入りの培地で培養し、コンフルエントになった段階で無血清培地 (Hybridoma-SFM、Invitrotec) と交換した後、さらに2日間の培養を行う。得られた培養上清をプロテインAカラム (Prosep-A、ミリポア) で精製し、精製キメラ抗体を得る。

【0082】

【発明の効果】

本発明の抗体は、コラーゲンと血小板の結合を抑制することにより血小板凝集能を低下させるので、例えば抗血小板薬等の医薬として用いることができる。また、本発明のヒト抗体は、医薬としてヒトに投与しても異種抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体の持つ免疫原性がない点で有用である。本発明の抗体で単独でヒト血小板の凝集を惹起しないものは、例えばFabにする等の処理をせずにそのまま医薬として投与することができる。本発明の抗体は既存の抗体よりも低用量でコラーゲンによる血小板凝集を抑制することができ、より少ない用量で医薬として有効である。

【0083】

【配列表】

<110> Mochida Pharmaceutical, Co., Ltd.

<120> Human antiplatelet membrane glycoprotein monoclonal antibody

<130> P03-0096

<160> 141

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Arg Ala Val Arg Gly Val Ile Ile Ile Arg Pro Pro Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Val
1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

His Phe Ile Leu Thr Gly Tyr His Tyr

1 5

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Gly Val
 1 5 10

<210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Ala Val Arg Gly Val Ile Ile Ile Arg Pro Pro Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Asn His Phe Ile Leu Thr Gly Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125

<210> 17

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gactactaca tgagc

15

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

tacattacta gtagtagtag ttacacaaac tacgcagact ctgtgaaggg c 51

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gatcgagcgg ttcggggagt tattataatc cgcccgccag actac 45

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

actggaacca gcagtgacgt tgggtggttat aactatgtct cc 42

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gatgtcagta atcgccctc a

21

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

agctcatata caagcagcag cactctggta

30

<210> 23

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

agctatgcca tgagc

15

<210> 24

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

cactttattt tgactggta tcactac

27

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

tctggaagca gctccaacat tgggaataat tatgtatcc

39

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gacaataata agcgaccctc a

21

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

ggaacatggg atagcagcct gagtgctggg gtg

33

<210> 29

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attactagta gtagtagtta cacaaactac	180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcga	300
gcggttcggg gagttattat aatccgcccg ccagactact ggggccaggg aaccctggtc	360
accgtctcct ca	372

<210> 30

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

cagtctgccc tgactcagcc ggcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc	60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaacaa	120
caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcaggggtt	180
tctaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc	240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cactctggta	300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact	360
ctgttccac cctcctct	378

<210> 31

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

```
gaggtgcagc tggtaggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt cgcaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaatcacttt      300
attttgactg gttatcacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca      354
```

<210> 32

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

```
cagtctgtct tgacgcagcc ggcctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc      60
tcctgtcttg gaagcagctc caacattggg aataattatg taccctggta ccagcagctc      120
ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag      240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgctgggggtg      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact      360
ctgttccac cctcctct      378
```

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 33

gctctagagc atgtctccat ccccgaccgc c

31

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 34

cgggatccgt tgcccttggt gtagtactg

29

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 35

aaaggatcca gatctaacga gcccaaattct tg

32

<210> 36

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 36

aaaggtaccc tatcatttac ccggagacag ggag

34

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 37

gaggtgcagc tgggtggagtc tgg

23

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 38

tgaggagacg gtgaccaggg ttcc

24

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 39

gaggtgcagc tggtggagtc tgg

23

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 40

tgaggagacg gtgaccaggg ttcc

24

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 41

cagtctgccc tgactcagcc ggc

23

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 42

agaggagggt gggaacagag tgac

24

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 43

cagtctgtct tgacgcagcc ggc

23

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 44

agaggagggt gggaacagag tgac

24

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 45

gttttcccag tcacgacgt

19

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 46

ctaatacgac tcactatagg

20

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asn Tyr Ala Met Ala

1

5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ala Ile Ser Val Ser Gly Thr Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Gly Leu Pro His Pro Lys Tyr Phe Cys Asp Ser

1 5 10

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Asn Tyr Met Ser

1 5

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Lys Ala Asp His Tyr Asp Ser Leu Ala Pro Asp Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Ser Tyr Asp Met His
1 5

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ala Gly Lys Met Trp Trp Arg Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Ile Thr Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Gly Tyr Thr Ser Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Thr Phe Tyr Ile His

1 5

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Phe Ile Asn Pro Ser Gly Val Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Asp

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Asp Thr Arg Gly Trp Ser Leu Asn Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Leu Ile Asn Gly Asp Gly Gly Gln Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Lys Arg Ser Gly Thr Tyr Tyr Asn Gly Leu Glu Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Phe Ile Ser Ser Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Arg Ser Ser Gly Phe Pro Phe Asp Leu

1

5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Ser Asn Tyr Met Ser

1 5

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Arg Trp Ser Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Thr Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Asp Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Val Ala Thr Asp Ala Phe Asp Ile

1 5

<210> 77

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Asp Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ser Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Thr Ser Gly Val Gly Val Gly

1 5

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Phe Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Arg Glu Ile Ala Ala Ala Gly Leu Tyr Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 83

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Asp Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Gly Pro Thr Ile Ala Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Asn Tyr Ala Met His

1 5

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Val Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15
Gly

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Glu Ile Gly Ala Ser Tyr Tyr Gly Ser Gly Gly Thr Pro Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 93

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Asp Leu Ala Ala Arg Pro Asn Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 95

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 97

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Asn Leu Pro Ala Pro Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Ala Leu

1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ala Tyr Asp Phe Val Ser

1 5 10

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Asp Val Arg Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Ser Phe Thr Thr Ser Ser Val Trp Val

1 5 10

<210> 101

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Met Gly Val

1 5 10

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Ser Gly Arg Ser Ser Asn Ile Glu Ser Asn Asn Val Asn

1 5 10

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Ser Ser Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Gln Val

1 5 10

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Lys Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Gly Val

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Cys

1 5 10

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val

1 5

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His

1 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala Cys Gly Val

1 5 10

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Leu Val

1 5 10

<210> 124

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Thr Phe Leu

1 5 10

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Leu Tyr Val
1 5 10

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Ala .

1 5 10

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Gln Gln Arg Ser His Trp Gln Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 136

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

【図面の簡単な説明】

【図 1】 GPVI-Fc発現プラスミドであるpCAGGS-GPVI-Fcの構築を示すフロー

チャートである。

【図2】 組換えウイルスを作製するためのトランスファーベクターのクローンであるpYNG-GPVI-Fcの構築を示すフローチャートである。

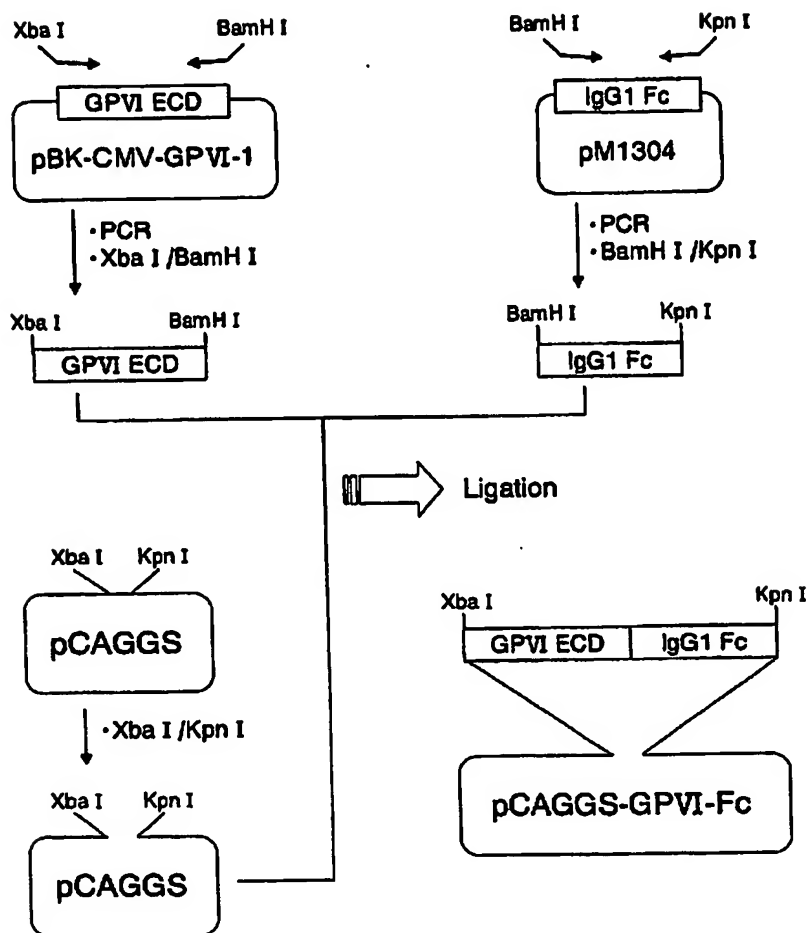
【図3】 抗GPVIモノクローナルヒト抗体18種類の結合活性を、GPVI-Fcとの反応性により、ELISA法で測定した結果を示したグラフである。

【図4】 #2-37抗体のGPVI-Fcのコラーゲンへの結合阻害活性をBIACOREにより示したグラフである。(A)はGPVI-Fcの結合及びヒトIgM抗体では阻害されないことを示している。(B)は#2-37抗体が濃度依存的に阻害することを示している。

【書類名】 図面

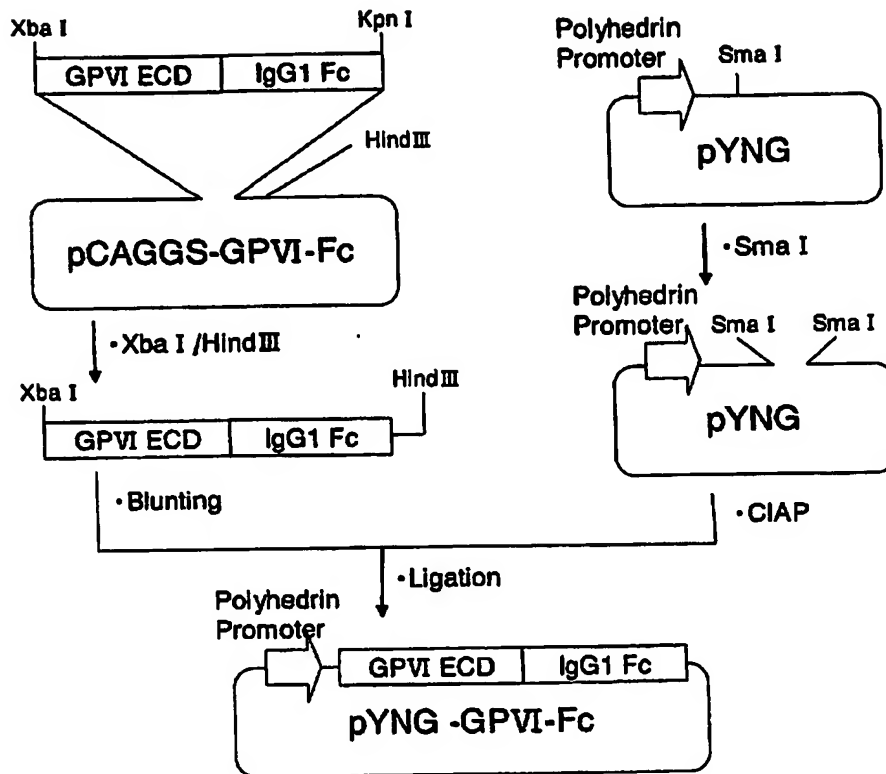
【図 1】

pCAGGS-GPVI-Fc の構築

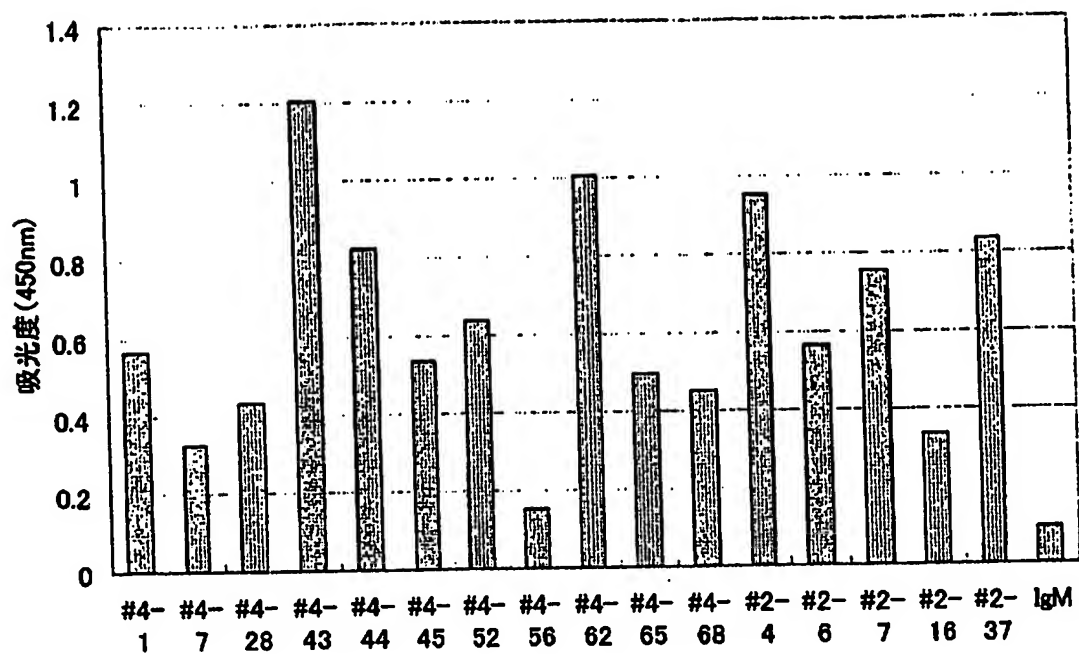


【図 2】

pYNG-GPVI-Fc の構築

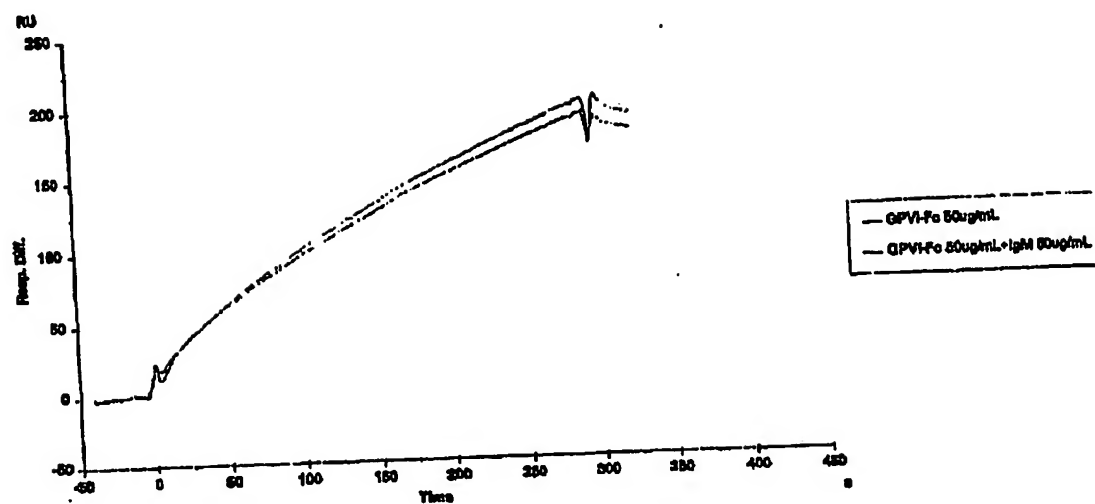


【図 3】

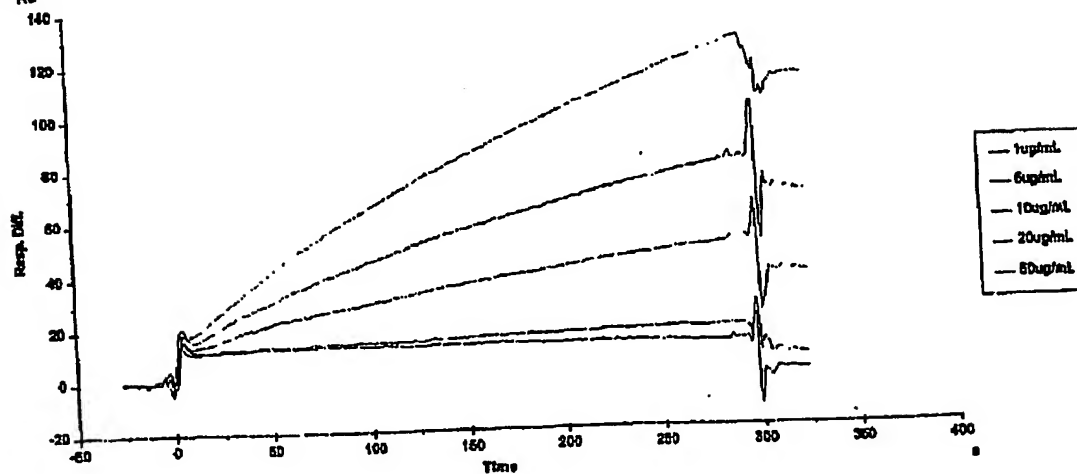


【図 4】

(A)



(B)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト血小板膜糖蛋白質 V I (G P V I) に特異的に結合する新規なモノクローナルヒト抗体、および該抗体を産生する細胞を提供する。

【解決手段】 G P V I に対する自己抗体を産生するヒトの末梢血リンパ球を特定の条件の体外免疫法 (in vitro immunization) で活性化し、マウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製する。そして、G P V I との結合能を有し、コラーゲンによる血小板凝集を抑制する活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得する。さらに、該抗体をコードする遺伝子を単離して、該抗体の C D R のアミノ酸配列を決定する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 9 9 1 9 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 8 1 1 4 7]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日
新規登録
東京都新宿区四谷 1 丁目 7 番地
持田製薬株式会社